

**Recherche des substances protéiques
dans les liquides d'éluage d'agglutinines
fixées sur des corps microbiens**

THÈSE

Pour le doctorat de l'Université de Lyon

SECTION DE PHARMACIE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT DEVANT LA

FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE

LE 30 NOVEMBRE 1939

PAR

EMILIE ROCHEDIX

née le 28 décembre 1914

aux VILLETES (Hte-Loire)



PAQUET Imprimeur
10, RUE JARENTE - LYON
1939

**Recherche des substances protéiques
dans les liquides d'éluage d'agglutinines
fixées sur des corps microbiens**

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

N° 301

**Recherche des substances protéiques
dans les liquides d'éluage d'agglutinines
fixées sur des corps microbiens**

THÈSE

Pour le doctorat de l'Université de Lyon

SECTION DE PHARMACIE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT DEVANT LA

FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE

LE 30 NOVEMBRE 1939

PAR

EMILIE ROCHEDIX

née le 28 décembre 1914

aux VILLETES (Hte-Loire)



PAQUET Imprimeur
10, RUE JARENTE - LYON
1939

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE.
Assesseur	M. A. MOREL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LANNOIS, HUGOUNENQ, PIC, CONDAMIN, PAVIOT,
NICOLAS, VILLARD, NOVE-JOSSERAND, TIXIER, COLLET, GAYET, CLUZET

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. FROMENT.
Cliniques chirurgicales	SAVY.
Clinique obstétricale et Accouchements.....	PATEL.
Clinique ophtalmologique	BERARD.
Cliniques dermatologique et syphiligraphique.....	VORON.
Clinique neurologique et psychiatrique.....	BONNET.
Clinique médicale infantile.....	FAVRE.
Clinique gynécologique	LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND.
Clinique urologique	COTTE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	REBATTU.
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.....	CIBERT.
Clinique des maladies infectieuses.....	TAVERNIER.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	COURMONT.
Chimie biologique et médicale.....	J. CHALIER.
Chimie organique et Toxicologie.....	PONTHUS.
Matière médicale et Botanique.....	FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....	MOREL
Anatomie	MANCEAU.
Histologie	GUIART.
Physiologie	LATARJET.
Pathologie interne	POLICARD.
Pathologie générale et thérapeutique.....	HERMANN.
Anatomie pathologique	CORDIER.
Chirurgie opératoire	CADE.
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie.....	J. F. MARTIN.
Médecine légale	SANTY.
Hygiène	ARLOING (F.).
Pharmacie et Pharmacologie.....	MAZEL.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie.....	ROCHAIX.
	LEULIER.
	PIERY.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale.....	MM. THEVENOT (Léon)
Chargé d'un cours d'embryologie	NOEL.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
GABRIELLE	P. RAVAUULT	CLAVEL	ROMAN.
CHAMBON	PIGEAUD	LEVRAU	JOURDAN.
REVOL	CROIZAT	BANSSILLON.	MOUNIER-KHUN.
ENSELME	DELORE	MALLET-GUY.	BROUSSY.
SEDALLIAN	JOSSERAND	PEYCELON.	PIFFAULT.
CREYSEL	MORIN	R. FROMENT.	
DE ROUGEOMONT	BERTRAND	P. E.-MARTIN.	



EXAMINATEURS DE LA THESE

M. ROCHAIX, *Président*
MM. MOREL, SEDALLIAN

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MON PERE ET A MA MERE

En témoignage de ma profonde affection

A MON FRERE

A MES PARENTS ET A MES AMIS

A MES CAMARADES DE L'INTERNAT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur ROCHAIX

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine
Membre du Conseil Supérieur d'Hygiène de France
Officier de la Légion d'Honneur

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. MOREL

Professeur de Chimie organique et de Toxicologie
Officier de la Légion d'Honneur

Monsieur le Professeur Agrégé SEDALLIAN

Chevalier de la Légion d'Honneur

A Madame Ch. CLAVEL

Ancien Interne des Hôpitaux
Chef de service à l'Institut Pasteur

A MES MAITRES

Avant-propos

Nous sommes heureuse de profiter de la soutenance de cette thèse pour assurer tous nos Maîtres de notre reconnaissance.

Nous remercions Monsieur le Professeur ROCHAIX qui a bien voulu accepter la présidence de notre thèse ainsi que Monsieur le Professeur MOREL, pour son enseignement éclairé au cours de nos études et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de nous juger.

Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Agrégé SEDALLIAN qui nous a inspiré le sujet de ce travail et aidé de ses conseils, nous accueillant toujours avec une grande bienveillance ; qu'il soit assuré de notre profonde reconnaissance.

Avec la plus grande amabilité Madame CLAVEL nous a préparé les liquides à étudier. Elle nous a beaucoup aidée de son travail et fut pour nous un guide précieux. Nous l'en remercions bien vivement.

Recherche des substances protéiques dans les liquides d'éluage d'agglutinines fixées sur des corps microbiens



Introduction

Nous nous proposons d'exposer dans cette thèse, des recherches effectuées sur le dosage de l'azote total dans les liquides d'éluage des agglutinines, obtenus d'après la méthode de récupération du Professeur SEDALLIAN et de Mme Ch. CLAVEL (1).

Le plan de notre travail est le suivant :

1° Fixation des agglutinines sur les bactéries et leur éluage : technique de la récupération des agglutinines.

2° Recherche et dosage de l'azote total dans les liquides d'éluage : technique de dosage.

3° Essai de caractérisation de l'azote trouvé : azote non protéique ; azote protéique : sérum-albumine, sérum-globuline.

Fixation des anticorps microbiens sur les bactéries et leur éluage

La notion qu'un anticorps fixé sur un antigène peut s'en dissocier, a été établie, il y a déjà longtemps sur les complexes toxines-antitoxines, car la précision du titrage de leurs deux constituants permet des expériences indiscutables. On est donc bien assuré aujourd'hui de la persistance des qualités des deux éléments d'un mélange apparemment neutralisé de toxine et d'antitoxine et de la possibilité de les dissocier.

En 1895, CALMETTE chauffe un mélange de venin et d'antitoxine venimeuse, détruit ainsi l'antitoxine, et retrouve le venin. GRASSBERGER et SHATTENFROH, font, peu après, une expérience analogue avec la toxine charbonneuse. En 1906, MORGENROTH, WILLANEN et ASCHER décomposent par les acides, les complexes toxine et antitoxine microbiennes. CALMETTE et MASSOL arrivent aux mêmes résultats avec la chaleur à 60° et l'alcool. BEHRING et MADSEN diluent simplement le complexe pour restituer la toxine. MADSEN et WALBUM réalisent la dissociation en gélatine. MADSEN et SCHMIDT utilisent encore dans ce but l'iodure de sodium.

Plus récemment, RAMON put obtenir, en concentration, l'antitoxine dissociée d'un flocculat toxine-antitoxine diphtérique. Il utilise le chauffage à 55° et détruit ainsi la toxine diphtérique très labile, après avoir fait agir un acide dilué pour séparer l'antitoxine qui lui était liée dans le flocculat. Il obtient un produit très actif, et très pauvre en azote.

LOCKE, MAIN et HIRCH (2) récupèrent l'hémolysine de globules rouges sensibilisés par un sérum particulièrement avide, en faisant d'abord un lavage à l'éther puis une extraction par un acide dilué.

EULER et BRUNIUS (3) obtiennent l'hémolysine d'un stroma sensibilisé, en le traitant par la glycérine.

OTTENBERG et STENBUCK (4) extraient l'agglutinine de bacilles typhiques sensibilisés, avec un alcali dilué, et la précipitent ensuite trois fois par une solution de chlorure de cuivre à Ph 6, pour éliminer les constituants bactériens.

Ces expériences sont confirmées par celles de NELIS (5), MARRACK et SMITH (6), MODERN et WERNICKE (7), et plus récemment par GOLDIE (8). Puis, se basant sur la thermostabilité de l'anatoxine, RAMON, LEGROUX et SCHOEN (9) utilisent le flocculat antitoxine-anatoxine, le soumettent à l'action d'un acide, le chauffent à 70° et obtiennent la destruction de l'antitoxine détachée et la persistance dans le produit d'une anatoxine concentrée, ayant gardé tous ses récepteurs, car elle floccule à nouveau avec le sérum spécifique.

La dissociation des complexes anticorps-antigènes microbiens devrait *a priori*, s'obtenir par des expériences simples. La possibilité de centrifuger les antigènes et de les séparer, soit du sérum avec lequel ils ont pu être mis en contact, soit des liquides d'éluage, facilite en effet de telles recherches. Mais les anticorps microbiens sont plus délicats et surtout moins facilement titrables que les antitoxines. Ils paraissent fixés plus solidement sur leurs récepteurs. Nous verrons d'ailleurs plus loin, si cet éluage est possible, combien sa réalisation expose à des erreurs et doit comporter de minutie.

Cependant, des recherches autrefois dispersées laissent entrevoir sa réalité. En 1896, BORDET voit des globules rouges agglutinés par un sérum se dissocier brusquement à 60° et s'agglutiner à nouveau lors du refroidissement.

LANDSTEINER et JAGIC (10) soumettent des globules rouges ayant fixé des agglutinines normales à l'influence de la chaleur à 65° et en récupèrent dans l'eau physiologique une faible quantité. BAIL et TSUDA (11), puis SPAET (12) ont fait agir la température à 56° sur des vibrions cholériques ayant adsorbé leur sensibilisatrice. HAHN et TROMMSDORF (13) traitent des bactéries sensibilisées, avec de $\text{J'SO}^4\text{H}^2$ N/100 et retrouvent de faibles quantités d'agglutinines. VON LIEBERMANN et FENYVESSY (14) traitent des globules rouges imprégnés de sérum hémolytique par de l'acide chlorhydrique N/100 et retrouvent le pouvoir hémolytique. BORDET (15), commentant toutes ces expériences, les considère comme indiquant « que des micro-

bes chargés d'agglutinines peuvent, à la condition d'en avoir adsorbé beaucoup et d'en être en quelque sorte saturés, laisser échapper spontanément un peu de principe actif lorsqu'ultérieurement on les plonge dans un liquide inerte. La combinaison serait réversible lorsqu'elle atteint un excès d'anticorps ».

Dans les recherches plus récentes, différents travaux importants ont abordé ce sujet. KOSAKI (16) établit que la sensibilisatrice hémolytique anti-mouton, peut se dissocier des globules rouges dans des solutions concentrées d'hydrate de carbone et HUNTON (17) étudie l'éluage des agglutinines dans les solutions de saccharose à 10/100, l'eau distillée, l'eau physiologique, le carbonate de soude, avec ou sans y surajouter l'action de la chaleur. Il en obtient la récupération, après les avoir fixées, en saturation partielle de sérum, sur des bactéries, et peut même entreprendre des recherches sur leur nature chimique.

M. le Professeur SEDALLIAN et Mme CLAVEL, dans des expériences récentes (1935) ont établi une technique permettant de réaliser avec régularité l'éluage des agglutinines et étudié l'influence de la proportion d'anticorps fixés par les bactéries sur leur récupération ultérieure.

TECHNIQUE DE LA RECUPERATION DES AGGLUTININES

1° Conduite générale des expériences. Leurs causes d'erreur

Elles ont été conduites d'après la méthode mise au point par M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL : un sérum monovalent antimicrobien de cheval ou de lapin est présenté

en saturation à ses bactéries homologues préalablement lavées. Après ce contact, ces bactéries sont à nouveau lavées puis émulsionnées dans un liquide d'éluage. Enfin cette dernière émulsion est centrifugée et la teneur en anticorps du liquide surnageant est titrée.

A. FIXATION DES AGGLUTININES SUR LES BACTERIES

L'adsorption des agglutinines, comme celle des autres anticorps, a été démontrée, on le sait, par GRUBER et DURHAM, puis par BORDET et a été appliquée par CASTELLANI à la séparation des coagglutinines.

EISENBERG et VOLK (18), dans des travaux déjà anciens, ont étudié les proportions d'anticorps fixés en rapport avec la concentration du sérum présenté aux bactéries, et selon eux une même masse bactérienne adsorbe d'autant plus d'agglutinines que le sérum présenté est plus concentré. Ceci est admis aussi par LASSEUR (19) que ce point de détail a également préoccupé. Mais il est difficile de le prouver. Car, en effet, si l'on recherche la perte en agglutinine d'un sérum concentré présenté à une certaine dose bactérienne et si l'on compare cette perte à celle de ce même sérum étudié en dilution plus étendue, on observe ceci : le sérum concentré, après contact avec les bactéries, paraît avoir conservé intégralement toutes ses propriétés et il n'est possible d'estimer la saturation de ses agglutinines qu'à partir d'une zone de dilution proportionnée à la masse bactérienne mise en épreuve. Ainsi lorsque l'on étudie seulement le titre d'un sérum restant après contact avec un antigène, tout se passe comme si aux for-

tes concentrations aucune agglutinine ne se fixe sur celui-ci.

Si, au contraire, comme EISENBERG et VOLK l'ont fait, on recherche la capacité réceptive des bactéries soumises préalablement les unes à l'action de fortes concentrations d'agglutinines, d'autres à celles de concentrations moindres, on constate que seules les premières se révèlent incapables de fixer de nouveaux anticorps.

Si l'on peut admettre qu'une bactérie fixe d'autant plus d'agglutinines que le sérum lui est présenté en fortes concentrations, il n'en reste pas moins qu'il n'est pratiquement pas possible de vérifier une adsorption autrement que par le titrage des agglutinines qui restent après contact. C'est-à-dire de faire une épreuve ordinaire de saturation. Les réflexions précédentes permettent de prévoir l'impossibilité de juger de cette saturation autrement qu'en diluant convenablement le sérum avant de le mélanger aux microbes. KRUMWIEDE, COOPER et PROVOST (20) estiment à 5 p. 100 de sa valeur maxima le taux de dilution du sérum devant être utilisé. M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL ont souvent observé qu'il est nécessaire de le diluer considérablement pour arriver à une épreuve de saturation correcte. A ce point de vue on ne saurait accepter les conclusions de Sophie SPICER (21). Pour cet auteur, la dilution à 1/10 de cmc. de sérum serait suffisante.

Nous avons donc opéré de la façon suivante : Pour chaque sérum antimicrobien, on établit la dilution à laquelle il faut l'amener pour assurer sa saturation complète après l'avoir mélangé, puis séparé de ses bactéries originelles. Ce taux de dilution devant jouer dans l'interprétation des

résultats de récupération un rôle intéressant, il est nécessaire d'insister sur ce titrage préalable. Une culture bactérienne de 24 heures est centrifugée, lavée, puis émulsionnée en eau physiologique afin d'avoir dans 1 cmc. de cette émulsion la masse microbienne de 40 cmc. de culture. Cette dose d'antigène est celle habituellement utilisée et elle correspond approximativement en pesée humide à 0 gr. 12 de bactéries. On dispose dans une série de tubes 1 cmc. de cette émulsion d'antigènes et du sérum dilué dans 1 cmc. d'eau, de telle sorte que le premier tube reçoive $1/2$ cmc. de sérum, le deuxième $1/4$, le troisième $1/8$, le quatrième $1/16$, etc. Après 24 heures de glacière, chaque mélange est centrifugé dans des supports en bois adaptables aux plots de la centrifugeuse et dans chacun desquels 4 ou 6 tubes peuvent être maintenus. On recueille ensuite le liquide surnageant de ces émulsions, on le titre au point de vue agglutination avec la bactérie originelle, comparativement à une dilution de sérum témoin.

Ainsi est établie pour chaque sérum la dose de dilution permettant de juger de sa saturation après un contact avec une masse bactérienne conventionnelle. Ce taux paraît bien correspondre de son côté à la capacité limite d'adsorption de la masse bactérienne éprouvée.

D'après NORTHROP et DE KRUIF (22), les agglutinines se fixent après une heure de contact avec les antigènes et il ne s'en adsorbe plus après quelques heures. Cela n'est vrai qu'en limitant à 24 ou 36 heures les titrages comparatifs, mais après 8 jours l'adsorption continue. M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL ont limité ce temps de contact à 24 heu-

res. La température des mélanges est de 0° à 5°. Tous sont effectués en eau physiologique.

B. LAVAGE DES BACTERIES SENSIBILISEES

Il doit être très minutieux, car après leur contact avec de fortes concentrations de sérum il en reste en inhibition autour des bactéries jusqu'au troisième lavage. Nous avons toujours exigé que l'eau physiologique ayant servi au dernier lavage ne décèle ni albumine ni agglutinines. Dans la pratique, le plus souvent trois lavages ont été estimés suffisants et même parfois un seul, lorsque la dose de sérum employée permet la saturation complète de ses agglutinines.

C. EMULSION DES BACTERIES SENSIBILISEES

DANS LE LIQUIDE D'ELUAGE

La nature du liquide d'éluage est, bien entendu, importante. Après avoir essayé et sans résultat apparent l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide azotique dilué, la soude à 0,44 p. 1000 (pH 12) et 2,24 p. 1000, l'acide sulfurique à 0,49 p. 1000 (pH 2), M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL ont utilisé l'acide chlorhydrique, additionné à l'eau distillée jusqu'à pH 1,4 à 1,7. Les résultats obtenus sont alors constants. Le temps de contact des liquides d'éluage avec les bactéries sensibilisées est en général de 24 heures. La température, celle de la glacière, de 0° à 5°.

D. LECTURE DES REACTIONS FINALES

Les liquides de récupération comme les sérums primitifs, étudiés parallèlement, sont éprouvés par la méthode

d'agglutination. L'agglutination est recherchée avec une culture en bouillon de la bactérie étudiée. Avec les liquides d'éluage acides, la lecture d'une agglutination offre quelque difficulté. On connaît depuis MICHAELIS l'agglutination acide des microbes. Celle-ci peut se retrouver dans les premiers tubes de dilution. Elle ne se voit pratiquement pas dans le deuxième, jamais dans le troisième où le mélange est déjà à pH 7 du fait de la dilution et grâce aux tampons du bouillon. Du reste des « témoins » en nombre suffisant, permettent d'éliminer cette cause d'erreur. Mais il y a plus : lorsqu'une émulsion bactérienne a été soumise à l'action d'un acide, celui-ci emporte avec lui des extraits bactériens qui précipitent à pH 7. De tels précipités, très nets lorsqu'on étudie de fortes masses microbiennes, sont, en fait, très minimes avec les quantités de microbes habituellement utilisées dans nos recherches et ils ne gênent pas les lectures. De plus, là encore un nombre suffisant de témoins (bactéries non sensibilisées, soumises à l'action du liquide d'éluage dont on étudie ensuite l'agglutination) permettent d'éliminer cette cause d'erreur.

2° Conditions d'une récupération régulière

A. INFLUENCE DE LA DILUTION DE SERUM PRESENTÉE AUX BACTERIES POUR LEUR SENSIBILISATION. RÔLE DE LA PROPORTION D'ANTIGENES BACTERIENS IMMOBILISÉS PAR LES AGGLUTININES, DANS LES EMULSIONS SOUMISES A L'ELUAGE.

On présente à une masse de corps bactériens répartie en quantité égale dans une série de tubes, des dilutions va-

riables de leurs sérums homologues. Puis le sérum restant étant titré après ce contact, on lave les bactéries jusqu'à disparition de toute trace d'anticorps dans les liquides de lavage. Ces bactéries sont ensuite émulsionnées dans le liquide d'éluage (acide chlorhydrique dilué à pH 1,7). En dernier lieu, ce liquide d'éluage est soumis à l'analyse après décantation par centrifugation des corps bactériens. Dans d'autres expériences dont on trouvera des exemples ci-dessous, la dose de sérum présentée est égale dans tous les tubes et nous avons fait varier la dose de microbes éprouvés, le volume total de toutes ces émulsions restant identique partout. L'éluage est toujours fait dans un volume de liquide égal au volume de celui des émulsions mises en contact.

Nous présentons quelques-uns de nos résultats. Ils sont sur les tableaux suivants qu'on interprètera ainsi :

Dans la colonne « saturation » correspondant à l'épreuve du sérum restant après contact bactérien, « totale » indique que la saturation a été complète et qu'on ne retrouve dans ce sérum aucune agglutinine ; 0,50, 0,25, etc. indiquent que le sérum a été privé de 50 p. 100 ou 25 p. 100 de son pouvoir primitif. Le mot « nulle » indique absence de saturation : les agglutinines ont été retrouvées jusqu'aux dilutions limites où elles existent encore dans le sérum neuf, non saturé.

Dans la colonne « récupération », correspondant au pouvoir agglutinant des liquides d'éluage : « nulle » signifie que l'on n'a retrouvé aucune agglutinine, « totale » que l'on a retrouvé autant d'agglutinines que dans le sérum

normal, 0,50, 0,25, que l'on a retrouvé 50 p. 100 ou 25 p. 100 des agglutinines qui avaient été présentées au contact des corps microbiens.

TABLEAU I

Microbe étudié : bacille typhique, culture liquide centrifugée et émulsionnée en eau : 10 cmc. d'émulsion égalent 100 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Eluage en eau acide (HCl), pH 1,4.

Volume total du mélange : 15 cmc.

QUANTITE EMULSION	QUANTITE DE SÉRUM	AGGLUTINATION	
		SATURATION	RECUPERATION
cmc.	cmc.		
10	1/50	totale	totale
10	1/25	totale	0,25
10	1/10	totale	0,05
10	2/10	totale	0,13
10	1/2	totale	0,13
10	1	0,75	0,50
10	2	0,75	totale
10	5	0,50	0,25

TABLEAU II

Microbe étudié : bacille d'Eberth. 1 cmc. d'émulsion égale
50 cmc. de culture liquide.

Sérum étudié : anti-Eberth de lapin.

Eluage en eau acide (HCl), pH 1,4.

Volume total de chaque mélange : 2 cmc.

QUANTITE EMULSION	QUANTITE DE SÉRUM	AGGLUTINATION	
		SATURATION	RECUPERATION
cmc.	cmc.		
1	1/1000	totale	nulle
1	1/750	totale	nulle
1	1/500	totale	nulle
1	1/250	totale	nulle
1	1/100	totale	nulle
1	1/50	totale	totale
1	1/25	totale	totale
1	1/10	totale	0,50
1	2/10	totale	0,12
1	1/2	0,90	0,12
1	1	0,75	0,25
1	2	0,75	0,25
1	3	nulle	0,12
1	4	nulle	0,12
1	5	nulle	0,12

TABLEAU III

Microbe étudié : bacille typhique, émulsionné en eau physiologique, de sorte que 1 cmc. d'émulsion égale 250 cmc. de culture liquide.

Eluage en eau acide (HCl), pH 1,4.

Volume total de chaque mélange : 10 cmc.

QUANTITE D'EMULSION MICROBIENNE	QUANTITE DE SERUM	AGGLUTINATION	
		SATURATION	RECUPERATION
cmc.	cmc.		
6	1/10	totale	nulle
5	1/10	totale	nulle
4	1/10	totale	nulle
3	1/10	totale	0,50
2	1/10	totale	0,50
1	1/10	totale	0,50
0,40	1/10	totale	0,25
0,20	1/10	totale	totale
0,08	1/10	totale	0,50
0,04	1/10	totale	0,50
0,02	1/10	totale	0,50
0,008	1/10	totale	0,50
0,004	1/10	0,75	0,50
0,002	1/10	0,50	0,25
0,0008	1/10	nulle	0,25
0,0004	1/10	nulle	0,25

Si l'on analyse ces tableaux et si l'on fait la part des marges d'erreur, inévitables dans les expériences de cet ordre, on est conduit aux observations suivantes :

1° La saturation des agglutinines ne peut pas s'apprécier, comme nous l'avons déjà exposé plus haut, tant qu'un sérum est présenté en forte concentration aux antigènes récepteurs. Il existe pour chaque sérum, toute chose restant égale du côté de la masse microbienne, un taux de dilution nécessaire et suffisant pour l'appréciation de sa saturation (23).

2° En ce qui concerne la récupération des agglutinines, si on peut la constater lorsque des bactéries ont été présentées préalablement à un sérum concentré, elle est maxima et constante lorsque le complexe anticorps antigène a été constitué avec une dilution de sérum exactement égale à celle qui permet d'apprécier la saturation. Autrement dit toute chose restant égale du côté de la masse microbienne, c'est lorsque le sérum a été présenté à la dilution nécessaire et suffisante pour assurer sa complète saturation que la récupération des agglutinines se réalise. Cette zone de récupération paraît correspondre à celle où il n'y a ni excès d'anticorps fixé, ni excès d'antigène libre dans les émulsions microbiennes soumises au liquide d'éluage.

B. AUTRES INFLUENCES

1° Influence de l'espèce animale produisant le sérum étudié : Il nous a semblé que le sérum de lapin permettait une meilleure récupération que les sérums de chevaux.

2° Les sérums frais sont préférables aux sérums vieillissants pour la réalisation d'un bon éluage.

3° Caractères et nature des liquides renfermant des anticorps récupérés

A. AU POINT DE VUE BIOLOGIQUE

Au cours de ses recherches, HUNTON a envisagé l'hypothèse suivante : dans la dissociation d'un complexe anticorps-bactérie, on obtient dans le liquide d'éluage non

point les anticorps isolés, mais des récepteurs auxquels restent accrochés une partie des anticorps. Ceux-ci se déplaceraient vers de nouvelles bactéries à l'occasion d'un nouveau contact. Il y aurait donc irréversibilité en fait du complexe et l'agglutination obtenue avec le liquide d'éluage ne serait autre chose qu'un phénomène analogue au phénomène d'Erlich. HUNTON s'est basé sur les faits suivants : les liquides qu'il a obtenus étaient toujours opalescents, les agglutinines qu'il a obtenues dans ces éluages n'ont pas filtré sur bougies. Enfin, dans une de ses expériences, un liquide d'éluage en saccharose a donné un titre plus élevé après un chauffage à 55°, comme si ce chauffage avait dissocié à nouveau un complexe.

D'après FELTON et BAILEY (24) les anticorps obtenus par la méthode de HUNTON (1921) et celle de GAY et CHICKERING (1915) sont impurs et entraînent un peu d'antigène. FELTON (25) obtient de meilleurs résultats avec les polysaccharides spécifiques des pneumocoques. Il se base sur le fait que les polysaccharides sont précipités par l'hydroxyde de calcium ou de strontium. Il dissout le précipité, formé par l'anticorps et les polysaccharides des pneumocoques I et II avec l'un ou l'autre de ces hydroxydes. La protéine spécifique est obtenue ensuite par dialyse.

De semblables préparations ont été obtenues par HEIDELBERGER, KENDALL et TEORELL (26) en dissolvant le précipité obtenu dans des solutions salines très concentrées et par CHOW et WU (27).

M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL, à la suite de leurs récents travaux, ont fait les constatations suivantes : il est effectivement difficile d'obtenir un liquide d'éluage très clair.

mais on finit par y arriver en centrifugeant assez longtemps. Comme l'a vu HUNTON, il est exact que les liquides d'éluage obtenus avec une solution de saccharose perdent leur pouvoir agglutinant par filtration.

Par ailleurs, ils ont remarqué, en faisant des épreuves de saturation, qu'un sérum complètement saturé et mal séparé de ses bactéries et encore opalescent après centrifugation n'agglutine point des microbes homologues servant à l'appréciation de sa saturation. Il n'y a donc pas translation de l'agglutinine fixée sur un antigène bactérien vers de nouveaux antigènes présentés en excès.

Ils ont constaté d'autre part, que lorsqu'on soumet de grosses masses bactériennes à l'action d'un acide dilué, on peut retrouver en solution des « extraits » précipitant à l'alcalinité. Si ces bactéries ont été préalablement soumises à l'action d'un sérum, les précédents précipités emportent avec eux une part des agglutinines éluées, mais la majeure partie reste dans la solution. Ces extraits n'ont eux-mêmes aucune aptitude à fixer les anticorps, aucun pouvoir immunisant sur l'animal. S'il y avait cependant dans les liquides d'éluage des récepteurs détachés de corps microbiens, c'est, selon toute vraisemblance, parmi ces extraits que l'on devrait les trouver.

Enfin les microbes, d'abord sensibilisés, puis dont on a détaché les anticorps, peuvent, s'ils sont bien neutralisés, fixer de nouveau des agglutinines comme s'ils n'avaient encore jamais subi l'influence d'un sérum. Ceci s'accorde mal avec l'hypothèse d'une perte en récepteur lors d'un éluage par les acides.

M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL ont constaté également que les agglutinines éluées par l'acide chlorhydrique peuvent se fixer à nouveau sur de nouvelles bactéries et en être éluées à leur tour.

B. AU POINT DE VUE CHIMIQUE

L'étude de la constitution chimique des anticorps a fait le sujet de nombreux travaux : pour certains, il s'agirait de substances protéiques mais la question est encore controversée. C'est un problème important, aussi bien au point de vue pratique qu'au point de vue théorique, pour permettre d'expliquer le mécanisme des réactions d'immunité.

La difficulté vient de la diversité des méthodes employées pour isoler les anticorps : méthodes non spécifiques — précipitation fractionnée des protéines du sérum et adsorption ; méthodes spécifiques basées sur la précipitation du complexe antigène-anticorps et extraction de l'anticorps.

M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL constatent que leurs liquides d'éluage sensibilisent le cobaye au choc anaphylactique. D'après MARRAK (28) la nature protéique des anticorps est mise en évidence par l'étude du complexe antigène-anticorps dans la réaction de précipitation par exemple : le précipité obtenu est plus riche en protéines que l'antigène. L'analyse des précipités obtenus avec différents antigènes montre qu'une partie infime du complexe appartient à l'antigène alors que la partie la plus importante est constituée par une protéine ressemblant à la sérum-globuline provenant du sérum. Cette protéine

liée aux antigènes est immunologiquement identique aux protéines du sérum spécifique.

BRAUN (29) constate que lorsque des bactéries agglutinées par un sérum spécifique sont injectées à des cobayes, elles les sensibilisent à une injection ultérieure de sérum de cheval.

SMITH et MARRAK (30), après avoir dissocié les complexes toxine diphtérique-sérum antitoxique, provoquent une nouvelle floculation avec la globuline du sérum étudié. En toute évidence, quand un antigène se combine à un anticorps, il prend une quantité appréciable de globuline au sérum. MARRAK et SMITH (31) remarquent que la quantité d'antigène dans le précipité dépend uniquement des proportions suivant lesquelles l'antigène et l'anticorps sont mélangés et n'est pas modifiée par l'addition de protéines étrangères non spécifiques.

DOUGLAS et DUDLEY (cités par HARTLEY [32]) trouvent 25 % du complexe obtenu dans une réaction de précipitation, soluble dans les solvants des graisses. MARRAK et SMITH (31 bis) en trouvent moins de 1 % dans le flocculat toxine diphtérique-antitoxine.

BREINL et HAUROWITZ (33) étudiant le complexe hémoglobine-antisérum, obtiennent de 2 à 8 % de lipides, dans lesquelles ils ne peuvent déceler ni galactose, ni phosphore, ni cholestérol. Récemment, SUMMER et KIRK (34) récupèrent l'antiuréase du complexe uréase-antiuréase en traitant par un acide, qui insolubilise l'uréase. L'antiuréase est une globuline insoluble dans l'eau, précipitable par un nouvel antigène.

Dans leurs liquides d'éluage d'hémolysines, LOCK, MAIN et HIRCH trouvent une faible quantité de protéines ; par contre, OTTENBERG et STENBUCK (1923-24) ne peuvent déceler la présence de substances protéiques dans leurs liquides d'éluage d'agglutinines.

Nos expériences ont eu pour but de rechercher l'azote dans les liquides d'éluage d'agglutinines obtenues d'après la méthode de M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL précédemment décrite, d'étudier l'influence de différents facteurs : temps de saturation, temps de récupération, récupération par la chaleur à 50°, quantité d'émulsion, quantité de sérum spécifique, etc., sur la récupération ultérieure de cet azote et enfin d'appliquer ces résultats à l'étude de la constitution chimique des anticorps. Pour cela, nous avons cherché à établir, par différentes expériences, une relation entre le pouvoir agglutinant des liquides d'éluage et leur teneur en azote. Nous sommes arrivée, par filtration sur bougie, à dissocier les propriétés spécifiques du complexe protéique et par des précipitations fractionnées par l'acide trichloracétique, l'acide phosphotungstique et la solution saturée de sulfate de soude, nous avons essayé de caractériser l'azote trouvé, sous forme d'azote protéique ou d'azote non protéique.

Dosage de l'azote total dans les liquides d'éluage

TECHNIQUE DE DOSAGE

Au lieu d'utiliser la méthode classique de KJELDAHL, qui est longue et nécessite une prise d'essai importante, on emploie de préférence les microméthodes plus rapides, permettant de faire des dosages suffisamment exacts avec de très faibles quantités de liquides à étudier.

Méthode de Kjeldahl. — Principe. Cette méthode est fondée sur la destruction et l'oxydation des matières organiques azotées, dont l'azote est transformé en ammoniacque, quand on les chauffe avec de l'acide sulfurique concentré et bouillant. Dans un second temps, on dose par acidimétrie l'ammoniacque formée, soit par distillation avec de la soude en recueillant l'ammoniacque dans un volume connu d'acide sulfurique titré, soit par acidimétrie par la méthode au formol. On peut encore, lorsque la prise d'essai est minime, faire le dosage de l'ammoniacque, après distillation, par la méthode de la nesslerisation, lorsque la quantité d'azote est de l'ordre d'une fraction de milligramme.

Microméthodes. — Parmi les microméthodes dérivées de la précédente, les plus employées sont, au laboratoire, la méthode de Folin modifiée par Polonowski et Vallée, et celle de Pregl ou micro-kjeldahl, dont l'appareil a été avantageusement modifié par Parnas et Wagner. Cet appareil, par son rinçage automatique permet de faire des centaines de distillations successives sans qu'on ait besoin d'enlever un seul raccord de caoutchouc. Nous l'avons donc adopté pour le travail en série que nous avons entrepris.

De nombreuses variantes ont été introduites dans l'exécution de la technique de Parnas et Wagner ; la minéralisation a été obtenue différemment suivant les auteurs : procédé de Kjeldahl, de Sörensen, de Boivin. Le dosage de l'ammoniaque a lui aussi été envisagé de plusieurs manières.

En ce qui nous concerne, pour la destruction des matières organiques, après avoir employé pour les premiers dosages, le mélange de Boivin modifié par Badinand (35) :

Sulfate de cuivre anhydre.....	0,025
Sulfate de potasse.....	0,50
Acide sulfurique 66° B.....	1 cme.

nous avons préféré utiliser le nouveau mélange de Duma-zert et Marcelet (36) au sélénite de mercure :

Sélénite de mercure.....	. 1 gr.
Sulfate acide de potasse fondu et pulv.	24 gr.

Ce mélange s'obtient aisément et à peu de frais par action du bichlorure de mercure ou de l'acétate mercurique en solution saturée sur du sélénite de soude. Il nous

a donné entière satisfaction. Après une minute de chauffage, le mélange devient violet, puis rouge et en cinq minutes la décoloration est achevée. D'après les résultats obtenus comparativement avec le mélange, acide sulfurique, sulfate de potasse, sulfate de cuivre anhydre, la récupération de l'azote est légèrement plus poussée, par conséquent meilleure.

Nous allons décrire plus en détail la technique que nous avons adoptée. Nous diviserons cet exposé en trois parties :

- 1° Appareils de mesure employés ;
- 2° Préparation des réactifs ;
- 3° Technique proprement dite.

1° Appareils de mesure

Pipettes. — Pour éviter toutes possibilités d'erreurs dans nos mesures, nous avons adopté des pipettes à deux traits vérifiées et contrôlées : pipettes de 1, 2, 5 et 10 cmc.

Burettes. — Nous avons employé une burette graduée au 1/20 de cmc., sur fond bleu, montée en cycle fermé.

Ballons jaugés de 10 cmc., 250, 500 et 1000 cmc.

Pour le nettoyage des pipettes, nous avons fait un triple rinçage à l'eau distillée, suivi d'un lavage à l'alcool à 95° et d'un séchage à l'éther.

2° Obtention des réactifs

Acide sulfurique pour minéralisation. C'est de l'acide sulfurique pur à 66°, conservé soigneusement à l'abri des vapeurs ammoniacales.

Lessive de soude pure, pour déplacement de l'ammoniaque dans l'appareil de Parnas et Wagner : on l'obtient par dissolution de la soude à l'alcool en plaques, selon les proportions données par le Formulaire des Hôpitaux Militaires (37). La lessive ainsi obtenue est portée à l'ébullition 20 minutes jusqu'à réaction négative au réactif de Nessler.

Solution de rouge de méthyle, employé comme indicateur. Elle se fait au titre de 1/4000 dans l'eau distillée chaude. On filtre après refroidissement.

Solutions titrées N/50 de soude et d'acide sulfurique ajustées l'une sur l'autre. Nous les préparons à partir de solutions N/10 d'acide sulfurique et de soude au moyen de ballons jaugés. On vérifie les 2 solutions : 10 cme d'acide sulfurique contenus dans une fiole d'Erlenmeyer doivent être exactement neutralisés par 10 cme. de soude écoulés de la burette au 1/20^e. Les solutions ainsi préparées sont conservées dans des flacons bouchant à l'émeri et vérifiées plusieurs fois au cours des dosages.

3° Technique proprement dite

- A. Répartition des liquides à étudier.
- B. Minéralisation, ou destruction des substances organiques, pour transformer l'azote en ammoniacque.
- C. Libération de l'ammoniacque : son dosage. Calculs.

A. Répartition des liquides à étudier

La teneur des liquides d'éluage en azote total étant extrêmement faible nous avons opéré sur des quantités aussi

grandes que possible ; ainsi les risques d'erreur sont réduits.

Nous avons adopté pour les liquides d'éluage, une prise d'essai de 5 cme. ; pour les émulsions microbiennes rendues homogènes par plusieurs agitations successives, une prise d'essai de 2 cme., 5 et pour les sérums spécifiques et les sérums normaux de lapins dilués au 1/40^e avec du sérum physiologique, une prise d'essai de 1 cme. Toutes ces quantités sont mesurées dans des matras de Kjeldahl à minéralisation.

B. Destruction des matières organiques : minéralisation

Dans le matras de Kjeldahl contenant la prise d'essai, on ajoute 0 gr. 30 du mélange minéralisateur de Dumas-zert et Marcellet, 1 cme d'acide sulfurique pur, et on porte le ballon sur la flamme d'un bec Bunsen. On engage le col du matras dans l'« aspirateur » de Guillaumin monté sur trompe à eau qui absorbe les vapeurs sulfuriques. L'opération est achevée en 5 minutes environ, lorsque le liquide après avoir charbonné, redevient limpide et prend une consistance sirupeuse. On retire du feu et laisse refroidir.

C. Dosage de l'ammoniaque produite

L'azote organique se transforme en ammoniaque qui reste fixée en sulfate d'ammoniaque. Après complet refroidissement, on reprend le contenu du ballon par un peu d'eau. On distille la solution ammoniacale obtenue après l'avoir nettement alcalinisée par une base fixe, telle que la soude. L'ammoniaque est entraînée dans un courant de vapeur d'eau. Le distillat est reçu dans 10 cme. de

solution d'acide sulfurique N/50 additionnés d'une goutte de rouge de méthyle. On dose l'excès d'acide non saturé par l'ammoniaque, par la soude N/50, après avoir préalablement porté le distillat une minute à l'ébullition, pour chasser le CO² qui pourrait retarder le virage du rouge de méthyle ; la soude est versée à l'aide d'une burette à fond bleu graduée au 1/20^e de cmc., burette montée en cycle fermé, ce qui évite tout contact avec l'air, de la liqueur alcaline.

CALCULS

Si l'on représente par n le nombre de cmc nécessaires pour neutraliser l'excès d'acide sulfurique (virage au jaune du rouge de méthyle), la teneur en azote est :

$$\frac{0,00028 \times (10 - n) \times 1000}{\text{prise d'essai}} = \text{Azote total p. 1000}$$

Liquides d'éluage

$$\frac{0,00028 \times (10 - n) \times 1000}{5}$$

Emulsions microbiennes

$$\frac{0,00028 \times (10 - n) \times 1000}{2,5}$$

Liquides saturés (sérums spécifiques et sérums normaux dilués au 1/40^e)

$$\frac{0,00028 \times (10 - n) \times 1000}{1}$$

Voici les résultats obtenus présentés sous forme de tableaux qu'on voudra bien lire ainsi :

Les « liquides saturés » correspondent aux sérums spécifiques et normaux de lapin, après contact microbien.

Les « liquides récupérés » sont les liquides d'éluage provenant de l'action des sérums spécifiques et des sérums normaux de lapin sur des microbes typhiques.

Les « microbes saturés » correspondent aux microbes après saturation par le sérum spécifique et le sérum normal.

Les « microbes récupérés » sont les microbes restant, après récupération des agglutinines par l'eau acide.

La teneur en azote des sérums avant et après saturation, des émulsions microbiennes avant et après agglutination, des liquides récupérés est exprimée en milligrammes par litre.

TABLEAU IV

Microbe étudié : bacille typhique, culture liquide centrifugée et émulsionnée en eau physiologique : 1 cmc. d'émulsion égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Eluage en eau acide (HCL à pH 1,4).

Saturation : 24 heures. — Récupération : 24 heures.

QUANTITE D'ÉMULSION	QUANTITE DE SÉRUM	AGGLUTINATION		AZOTE DES Liq. récupérés par litre
		Saturation	Récupérat.	
cmc.	cmc.			mgs.
5	1/10	totale	totale	100,80
5	1/5	totale	totale	103,60
5	0	totale	nulle	84
5	1/5	totale	nulle	86
	sérum normal			
0	1/10	1/24000		
	sérum normal			

TABLEAU V

Emulsion microbes typhiques : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Saturation : 24 heures. — Récupération : 20 minutes à la glacière.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Azote des liq. saturés	Azote des liq. récupérés	Azote des microbes récupérés	Azote eaux 1 ^{er} lavage apr. saturation	Azote eaux 2 ^e lavage ap. récupérat.
cmc.	cmc.	p. lit. mgrs	p. lit. mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs
5	1/2	420	86,80	660,80	0	5,60
5	1/2	98	42	621,60	2,8	2,80
	sérum normal					
5	eau	30,80	28	649,60	0	8,4

Témoin sérum antityphique : 224 mgrs p. 1000

Témoin émulsion microbienne : 784 mgrs p. 1000

TABLEAU VI

Emulsion de microbes typhiques IV : 1 cmc égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Saturation : 24 heures à la glacière. — Récupération : 20 minutes à la glacière.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Azote des liq. saturés	Azote des liq. récupérés	Azote des microbes saturés	Azote des microbes récupérés
cmc.	cmc.	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs
5	4/10	322	22,40	408,80	364
5	4/10	98	14	364	336
	sérum normal				
5	0	14	5,60		319,20

Témoin émulsion microbienne : 364 mgrs p. 1000

Témoin sérum antityphique : 238 mgrs p. 1000

Témoin sérum normal : 98 mgrs p. 1000

La teneur en azote des eaux de lavage étant négligeable, nous en avons supprimé le dosage dans cette expérience et les suivantes.

TABLEAU VII

Emulsion de microbes typhiques 2 : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique 2.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Azote des liq. saturés	Azote des liq. récupérés	Azote des microbes saturés	Azote des microbes récupérés
cmc.	cmc.	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs
5	1/4	224	28	224	162,40
5	1/4	224	8,40	190,40	123,20
	sérum normal				
5	0	28	14		145,60

Témoin émulsion microbienne : 224 mgrs p. 1000

Témoin sérum antityphique 2 : 224 mgrs p. 1000

Témoin sérum normal : 224 mgrs p. 1000

TABLEAU VIII

Emulsion microbes typhiques, labo : 1 cmc égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Saturation : 24 heures à la glacière. — Récupération : 20 minutes à la glacière.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Azote des liq. saturés	Azote des liq. récupérés	Azote des microbes saturés	Azote des microbes récupérés
cmc.	cmc.	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs	par litre mgrs
5	1/4	224	42	324,80	274,40
5	1/4	196	25,20	313,60	268,80
	sérum normal				
5	0	0	28		263,20

Témoin microbes : 364 mgrs p. 1000

Témoin sérum antityphique : 238 mgrs p. 1000

Témoin sérum normal : 210 mgrs p. 1000

TABLEAU IX

RECUPERATION PAR LA CHALEUR A 50° EN EAU DISTILLEE

Emulsion de bacilles typhiques : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Saturation : 24 heures à la glacière. — Récupération : 48 heures à la glacière.

Quantité d'émulsion cmc.	Quantité de sérum cmc.	Agglutination		Azote des liq. récupérés mgrs par litre
		Saturation	Agglutin.	
1) 5	3/10	0,50	0,25	33,60
2) 5	3/10	0,50	nulle	72,80

1 : Récupération en eau acide.

2 : Récupération par la chaleur.

La récupération en eau acide est assez bonne, alors qu'avec la chaleur à 50° en eau distillée, elle est très médiocre. Par contre la teneur en azote des liquides d'éluage obtenus par la chaleur est supérieure à celle des liquides acides.

TABLEAU X

INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SERUM
SUR LA RECUPERATION DES AGGLUTININES

Emulsion de bacilles typhiques : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Saturation : 24 heures à la glacière. — Récupération : 48 heures à la glacière.

Quantité d'émulsion cmc.	Quantité de sérum cmc.	Agglutination		Azote des liquides de récupération mgrs
		Saturat.	Récupérat.	
5	2	totale	totale	160
5	1/2	0,75	0,50	100
5	1/10		totale	56
5	0		nulle	47,60

TABLEAU XI

Emulsion de bacilles typhiques 2 : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum antityphique de lapin 2.

Saturation : 24 heures à la glacière. — Récupération : 48 heures à la glacière.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Agglutination		Azote des liq. saturés	Azote des liq. récupérés	Azote des microbes récupérés
		Saturat.	Récupérat.			
cmc.	cmc.			p. lit. mgrs	p. lit. mgrs	p. lit. mgrs
6	1/4	totale	totale	224	14	201,60
6	1/4 x 5	nulle	0,20	910	39,20	179,20
6	1/4 x 16	nulle	0,10	1834	78,40	151,20
6	0		nulle		5,60	151,20

Témoin émulsion microbienne : 263 mgrs p. 1000

Témoin sérum antityphique : 238 mgrs p. 1000

TABLEAU XII

Emulsion de bacilles typhiques 2 : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

S'rum antityphique 2.

Saturation : 24 heures à la glacière. — Récupération : 48 heures à la glacière.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Agglutination		Azote des liq. saturés	Azote des liq. récupérés	Azote des microbes récupérés
		Saturat.	Récupérat.			
cmc.	cmc.			p. lit. mgrs	p. lit. mgrs	p. lit. mgrs
6	1/4	totale	0,50	308	86,80	252
6	1/4 x 5	0,50	0,50	588	109,20	319,20
6	1/4 x 16	nulle	0,25	1904	154	324,80
6	1/4		nulle	294	89,60	313,60
	sérum normal					
6	1/4 x 5		nulle	700	89,60	336
	sérum normal					
6	1/4 x 16		nulle	1988	109,20	380,80
	sérum normal					

Témoin émulsion microbienne : 266,80 mgrs p. 1000

Témoin sérum antityphique : 294 mgrs p. 1000

Témoin sérum normal : 280 mgrs p. 1000

*
**

Si l'on examine ces tableaux en tenant compte des marges d'erreurs possibles dans cet ordre d'expériences, on constate que, suivant les observations déjà faites, la saturation s'apprécie difficilement avec de fortes concentrations de sérum et la récupération des agglutinines est meilleure lorsque le sérum est présenté à la dilution nécessaire et suffisante.

On constate d'autre part, que la quantité d'azote trouvée dans les liquides d'éluage varie proportionnellement avec la quantité de sérum mise en contact avec les microbes.

Il est intéressant de remarquer que lorsqu'on fait agir des doses croissantes de sérum sur les microbes, la quantité d'azote adsorbée par ces microbes est de plus en plus importante et les liquides saturés sont proportionnellement de moins en moins riches en azote.

TABLEAU XIII

INFLUENCE DE L'ANCIENNETE DE L'ÉMULSION MICROBIENNE
SUR LA RECUPERATION DES AGGLUTININES

Emulsion récente de bacilles typhiques : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Emulsion ancienne de bacilles typhiques : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum de lapin antityphique.

Quantité d'émulsion	Quantité de sérum	Agglutination		Azote des liquides récupér. p. litre
		Saturat.	Récupérat.	
5 émulsion récente	1/2	totale	totale	75,60
5 émulsion récente	0		nulle	28
5 émulsion récente	1/2	totale	totale	75,60
5 émulsion ancienne	0		nulle	36,40

La récupération des agglutinines se fait aussi bien avec une émulsion ancienne qu'avec une émulsion récente.

INFLUENCE DU TEMPS DE SATURATION
ET DU TEMPS DE RECUPERATION SUR LA RECUPERATION
DES AGGLUTININES

TABLEAU XIV

Quantité		Saturation		Récupération		Azote des liq. récupérés
émuls.	sérum	temps	degré	temps	degré	
5	1/2	1 h ^{re} labo	totale	35 min.	0,25	95,20
5	1/2	1 h ^{re} labo	totale	18 h. glac.	0,25	103,60
5	1/2	18 h. glac.	totale	48 h. glac.	0,25	126

Le temps de saturation et de récupération variant de 1 heure à 24 heures n'a pas d'influence sur le pouvoir agglutinant et la teneur en azote du liquide récupéré.

INFLUENCE DU TEMPS DE RECUPERATION

TABLEAU XV

Emulsion de microbes typhiques, labo : 1 cmc égale 40 cmc. de culture.

Sérum antityphique : 2.

Quant. émuls.	Quant. sérum	Temps de récupér.	Agglutination		Azote des liquides récupérés par litre mgr. p. 1000
cmc.	cmc		Satur.	Récupér.	
5	1/4	30 minut.	totale	totale	26,20
5	1/4	24 heures	totale	totale	22,40
5	1/4	6 jours	totale	totale	25,20
5	1/4	30 minut.		nulle	19,60
	sérum normal				
5	1/4	24 heures		nulle	16,80
	sérum normal				
5	1/4	6 jours		nulle	22,40
	sérum normal				
5	0	30 minut.		nulle	14
5	0	6 jours		nulle	14

Témoin sérum spécifique : 266 mgrs p. 1000

Le temps de récupération n'influe pas sur le taux de l'agglutination et la teneur en azote des liquides récupérés.

INFLUENCE DE LA FILTRATION SUR LE POUVOIR AGGLUTINANT
ET LA TENEUR EN AZOTE DES LIQUIDES DE RECUPERATION

TABEAU XVI

Emulsion de bacilles typhiques : 1 cmc. égale 40 cmc. de culture.

Sérum antityphique de lapin.

Saturation : 18 heures à la glacière. — Récupération : 18 heures à la glacière.

Liquide récupéré A provient de l'action du sérum spécifique sur les microbes.

Liquide récupéré B provient de l'action de l'eau d'éluage sur ces mêmes microbes.

	Agglutination		Azote des liqu. récupérés p. litre
	Saturation	Récupér.	
Liq. récupéré A	0,50	0,25	131,60
Liq. récupéré B	nulle	nulle	84
microbes seuls			
Liq. récupéré filtré A (5 cmc. liq. A donnent 2 cmc. 5 de filtrat)		nulle	147,70
Liq. récupéré filtré B (5 cmc. liq. B donnent 2 cmc. 5 de filtrat)		nulle	210

TABEAU XVII

Emulsion de bacilles typhiques III.

Sérum de lapin antityphique.

	Agglutination	Azote des liqu. récupérés p. litre
Liquide récupéré	1/12000	72,80
Liquide récupéré filtré.. (12 cmc. liq. donnent 6 cmc. de filtrat)	nulle	137,20

La filtration enlève le pouvoir agglutinant du liquide récupéré, mais ne semble pas modifier la teneur en azote.

Essai d'identification de l'azote des liquides d'éluage

Les liquides d'éluage renfermant une quantité faible mais constante d'azote, nous nous sommes proposée d'identifier cet azote sous forme d'azote protéique ou d'azote non protéique.

Précipitation de l'azote protéique

Nous avons utilisé comme réactifs précipitants, l'acide trichloracétique au 1/2 et l'acide tungstique, suivant des proportions que nous indiquons dans les tableaux ci-joints. Après agitation, on recueille le précipité et le filtrat par filtration ou centrifugation. Un dosage d'azote dans le liquide initial et dans le filtrat, donne par différence la quantité d'azote protéique.

Précipitation des globulines

Nous avons utilisé la technique de Howe employée habituellement pour la précipitation des globulines dans le sérum. On prépare une solution aqueuse de sulfate de soude pur contenant par litre 222 gr. de sel anhydre. On vérifie le sulfate de soude employé en évaporant un volume connu de cette solution et calcinant, on doit trouver

22,20 % de résidu sec. Cette solution est ajustée à la température de 37°, puis conservée en flacons bouchés à la même température.

On ajoute ce réactif à la prise d'essai suivant les proportions indiquées dans les tableaux ci-joints. On place le vase à précipitation, bouché, à l'étuve où on le laisse 3 heures. Ce temps est nécessaire pour une précipitation complète des globulines, mais il peut être dépassé sans inconvénient. Les globulines donnent alors un léger précipité qu'on isole par filtration sur un papier peu serré. La filtration est faite à l'étuve en recouvrant l'entonnoir d'une plaque de verre. On repasse le liquide plusieurs fois sur l'entonnoir jusqu'à limpidité parfaite.

Nous présentons quelques-uns de nos résultats dans les tableaux suivants. Malgré la précision et la régularité de ces deux méthodes de précipitation, nous avons eu beaucoup de difficultés à obtenir des résultats constants, étant donnée la quantité très faible d'azote contenue dans les liquides d'éluage.

TABLEAU XVIII

Nous allons étudier un liquide de récupération d'agglutinines, provenant de l'action d'un sérum antityphique sur des microbes typhiques (Récupéré 1). Comme témoins, nous avons un liquide récupéré provenant de l'action d'un sérum normal sur des microbes typhiques (Récupéré 2) et un liquide récupéré provenant de l'action de l'eau acide sur des microbes typhiques sans adjonction de sérum (Récupéré 3).

Précipitation des protéines (sérum et globuline) par l'acide trichloracétique

2 cmc., 5 Réc.	1 + 1 cmc. ac. trichl. au 1/2	donnent filtrat 1 : agglutination au 6 ^e tube.
3 cmc., 7 Réc.	3 + 1 cmc.	— — — 2 : pas d'agglutination.
3 cmc., 7 Réc.	3 + 1 cmc.	— — — 3 : pas d'agglutination.
Témoin trichloracétique 1 : agglutination au 6 ^e tube.		
Témoin —	2 :	pas d'agglutination.
Témoin —	3 :	pas d'agglutination.

Précipitation des globulines par une solution de sulfate de soude à 222 gr. 0/00

2 cmc., 5 Réc.	1 + 10 cmc. SO^4Na^2 à 222 0/00	donnent filtrat 1 : pas d'agglutination.
2 cmc., 5 Réc.	2 + 10 cmc.	— — — 2 : pas d'agglutination.
2 cmc., 5 Réc.	3 + 10 cmc.	— — — 3 : pas d'agglutination.
Témoin SO^4Na^2 pas d'agglutination.		

TABLEAU XIX

Même expérience que précédemment. On obtient un liquide de récupération 1 (sérum antityphique 2 sur microbes typhiques), un liquide de récupération 2 (sérum normal sur ces mêmes microbes), un liquide de récupération 3 (eau acide sur mêmes microbes).

Teneur en azote du liquide récupéré 1 : 50 mgrs., 30 p. 1000

Teneur en azote du liquide récupéré 2 : 46 mgrs., 60 p. 1000

Précipitation des protéines par l'acide trichloracétique au 1/2

2 cmc., 5 Réc. 1 + 1 cmc. ac. trichl. au 1/2 donnent 1 cmc., 7 filtrat renfermant 98 mgrs p. 1060 d'azote et pas de précipité.

L'agglutination dans le liquide récupéré filtré est égale à celle obtenue dans le liquide initial.

Précipitation des protéines par l'acide tungstique

2 cmc., 5 Réc. 1 + 1/2 cmc. tungstate de soude à 10 % + 1/2 cmc. SO_4H_2 2/3N donnent 1 cmc. 7 de filtrat renfermant 70 mgrs 0/00 d'azote et un léger précipité.

L'agglutination dans le liquide récupéré filtré est du 1/3 de celle obtenue dans le liquide récupéré initial.

2 cmc., 5 Réc. 2 + 1/2 cmc. tungstate de soude à 10 % + 1/2 cmc. SO_4H_2 2/3N donnent 1 cmc., 7 filtrat renfermant 56 mgrs. p. 1000 d'azote.

2 cmc., 5 Réc. 3 + 1/2 cmc. tungstate de soude à 10 % + 1/2 cmc SO_4H_2 2/3N donnent 1 cmc., 7 filtrat renfermant 56 mgrs p. 1000 d'azote.

De nos propres recherches, il résulte les constatations suivantes : Les liquides d'éluage obtenus en traitant par de l'eau faiblement chlorhydrique, des microbes typhiques sensibilisés par un sérum spécifique, renferment une très faible quantité d'albumine. Dans cette albumine, il faut considérer plusieurs choses : des éléments non spécifiques et des éléments qui paraissent liés aux propriétés spécifiques.

1° Les éléments non spécifiques sont en grande partie des albumines microbiennes arrachées aux microbes par l'eau acide, comme le montrent les précédents tableaux. Dans chacune de nos expériences, nous avons pris en effet comme témoin, un liquide récupéré provenant de l'action de l'eau acide sur des microbes typhiques non saturés préalablement de sérum spécifique et nous avons toujours constaté la présence d'albumine dans ce liquide témoin. Ces albumines microbiennes ne sont pas elles-mêmes des antigènes puisque les microbes qui ont subi l'éluage, sont encore capables de fixer à nouveau des agglutinines, alors que si on leur avait enlevé une partie antigène, on ne retrouverait pas d'agglutinines dans le deuxième liquide de récupération.

2° Nous avons constaté par ailleurs que lorsqu'on met en contact du sérum de lapin non spécifique avec des microbes typhiques, on peut, même après plusieurs lavages successifs qui entraînent complètement les dernières traces de sérum, dissocier de ces microbes des substances protéiques non spécifiques. Il y a donc eu adsorption pure-

rement physique, non spécifique, des protéines du sérum par les microbes.

3° Si l'on considère les résultats obtenus au cours de nos travaux, une conclusion s'impose : la teneur en azote des liquides d'éluage actifs provenant de l'action d'un sérum antityphique sur des microbes typhiques, est toujours plus élevée que celle des liquides d'éluage témoins obtenus en traitant ces mêmes microbes par un sérum normal (voir les tableaux ci-dessus).

On peut se demander si cette albumine spécifique est constituée de globuline ou non. Lorsqu'on traite un liquide récupéré par une solution de sulfate de soude à 222 gr. p. 1000, les globulines seules sont précipitées et le filtrat perd son pouvoir agglutinant. Ce sont donc bien les globulines qui sont le support des propriétés spécifiques des sérums. Ces résultats obtenus sur les liquides d'éluage sont d'ailleurs en accord avec tous ceux obtenus déjà par différents auteurs, sur les sérums spécifiques : par des précipitations fractionnées, on est arrivé à isoler dans les globulines, deux albumines, la pseudoglobuline et l'euglobuline. Les anticorps seraient adsorbés par l'euglobuline.

Mais nous avons observé, en revanche deux faits :

a) Il est possible de dissocier le pouvoir agglutinant de la présence des globulines, par filtration sur bougie. Les albumines passent en concentration normale, mais le pouvoir agglutinant disparaît dans le filtrat, retenu sans doute par adsorption sur le filtre.

b) Il n'y a pas, d'autre part, proportionnalité entre la teneur en protéines des liquides d'éluage et leur pouvoir agglutinant. Certains liquides d'éluage très pauvres en azote (20 mgrs par litre) ont un pouvoir spécifique très élevé ; d'autres au contraire, riches en protéine, se révèlent peu actifs au point de vue immunologique. Les liquides témoins provenant de l'action d'un sérum normal ou de l'eau chlorhydrique sur les microbes typhiques renferment toujours et en assez grande quantité des protéines et cependant n'ont aucune propriété spécifique. De sorte qu'on ne peut pas affirmer que les agglutinines soient nécessairement des globulines. Très probablement, elles sont de par leur nature physique liées aux globulines qui les supportent et les protègent, mais elles ne sont pas elles-mêmes des globulines.

Conclusions

Lorsqu'on procède à l'éluage des agglutinines fixées sur des corps bactériens, par la méthode de M. SEDALLIAN et Mme CLAVEL, on constate les faits suivants :

1° La dissociation du complexe antigène-anticorps, quoique possible lorsque de fortes concentrations de sérum ont été présentées aux bactéries, ne se réalise avec régularité que dans des conditions très précises. Il faut qu'une certaine proportion d'agglutinines soit fixées sur les bactéries et que celles-ci n'aient ni excès d'anticorps sur leurs récepteurs, ni excès d'antigènes encore libres.

2° Les agglutinines récupérées se fixent sur des bactéries neuves et peuvent s'éluer à nouveau de celles-ci.

3° Ce sont bien des agglutinines spécifiques.

4° Lorsqu'on sature des microbes par un sérum spécifique, il y a adsorption du sérum sur les bactéries.

5° Les liquides d'éluage contiennent toujours une faible quantité de protéines, dont une partie provient des microbes utilisés dans la réaction d'agglutination.

6° La teneur en azote des liquides d'éluage actifs, provenant de l'action d'un sérum spécifique sur les bactéries homologues, est toujours plus élevée que celle des liquides d'éluage inactifs provenant de l'action d'un sérum normal ou de l'eau chlorhydrique sur ces mêmes microbes.

7° Il n'existe pas de proportionnalité entre la teneur en azote des liquides actifs et leur activité immunologique.

Le Président de la Thèse,
A. ROCHAIX.

Vu :
Le Doyen,
Jean LÉPINE.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 1^{er} novembre 1939
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
A. LIRONDELLE.

Bibliographie

- (1) SEDALLIAN et Mme CLAVEL. — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 114, p. 52 ; 1934, 115, p. 60, 61, 1542, 1545, 1696 ; 1935, 118, p. 887.
— *Revue d'Immunologie*, mai 1935, n° 3.
- (2) LOCKE, MAIN and HIRSCH. — (1926), *J. inf. Dis.*, 39, p. 126.
- (3) EULER et BRUNIUS. — (1930), *Z. Immun. Forsch.*, 68, p. 124.
- (4) OTTENBERG and STENBUCK. — (1923-24), *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.*, 21, 303.
- (5) NÉLIS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, 104, p. 1060.
- (6) MARRACK et SMITH. — *Proc. Roy. Soc. Biol.*, 1930, p. 106.
- (7) MODERN et WERNICKE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, 105, p. 119.
- (8) GOLDIE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, cxviii, p. 220.
- (9) RAMON, LEGROUX et SCHÖEN. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 106, p. 525.
- (10) LANDSTEINER et JAGIC. — *Munch. Med. Woch.*, 1903, 50 p. 764.
- (11) BAIL et TSUDA. — *Zeitsch. f. Immunol.*, 1909, 1, p. 546.
- (12) SPAET. — *Zeitschr. f. Immunol.*, 1910, 7, p. 712.
- (13) HAHN et TROMMSDORF. — *Munch. Med. Woch.*, 1900, 47, p. 413.
- (14) V. LIEBERMANN et FENYVESSY. — *Centralbl. f. Bakt.*, 1908, 47, p. 274.

- (15) BORDET. — *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses* (Masson, édit.), 1920, p. 293. — *Annales Institut Pasteur*, 1899, 13, p. 225.
- (16) KOSAKI. — *Journ. of Immunol.*, 1918, 3, p. 109.
- (17) HUNTON, ETRIS, MASUCCI et HANNUM. — *Journ. of Immunol.*, 1921, 6, p. 117.
- (18) EISENBERG et VOLK. — *Zeitschr. f. Hyg.*, 1902, 40, p. 155.
- (19) LASSEUR. — *Arch. f. Microb.*, 1930, 1, p. 131.
- (20) KRUMWIEDE, COOPER et PROVOST. — *Journ. of Immunol.*, 1925, 10, p. 54.
- (21) SPICER. — *Journ. of Immunol.*, 1931, 21, p. 142.
- (22) NORTHROP et DE KRUIF. — *Journ. Génér. Physiol. Biol.*, 1922, 1923, 5, p. 127.
- (23) ROCHAIX, SEDALLIAN, CLAVEL. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 108, p. 84.
- (24) FELTON et BAILEY. — *J. infect. Dis.*, 1926, 38, p. 131 et 145.
- (25) FELTON. — *J. Immunol.*, 1932, 22, p. 453.
- (26) HEIDELBERGER, KENDALL et TEORELL. — *J. exp. Med.*, 1936, 63, p. 819.
- (27) CHOW et WU. — *Chin. J. Physiol.*, 1937, 11, p. 139 et 169.
- (28) MARRACK. — *The Chemistry of Antigens and Antibodies*, 1938.
- (29) BRAUN. — *Z. Immunol. Forsch.*, 1909, 3, p. 53.
- (30) SMITH et MARRACK. — *Brit. J. Exp. Path.*, 1930, 11, p. 494.
- (31) MARRACK et SMITH. — *Brit. J. exp. Path.*, 1931, 12, p. 30 et 182.
— *Brit. J. exp. Path.*, 1932, 13, p. 394.
- (32) HARTLEY. — *Brit. J. exp. Path.*, 1925, 6, p. 112 et 180 ; 1926, 7, p. 55.
- (33) BREINL et HAUROWITZ. — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1930, 192, p. 45.
- (34) SUMMER et KIRK. — *Hoppe-Seyl. Z.*, 1932, 205, p. 219.

- (35) BADINAND. — Les Protéines du sérum (*Thèse Pharmacie*,
Lyon, 1930).
- (36) DUMAZERT et MARCELET. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, février
1938.
- (37) *Formulaire des Hôpitaux Militaires*, 1913, T. II, p. 426.
-

